

УДК 51-76:577.322:539.19

И. А. КАШИН¹, А. В. ТУЗИКОВ², А. М. АНДРИАНОВ¹**ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ НОВЫХ АНТИ-ВИЧ АГЕНТОВ –
ПЕПТИДОМИМЕТИКОВ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА VRC01,
ПРОЯВЛЯЮЩЕГО ШИРОКУЮ ВИРУСНУЮ НЕЙТРАЛИЗАЦИЮ**

(Представлено членом-корреспондентом И. А. Михайлопуло)

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск²Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси, Минск

Поступило 30.12.2013

Введение. Внедрению ВИЧ-1 в макрофаги и Т-лимфоциты предшествует связывание белка gp120 оболочки вируса с первичным рецептором CD4 клеточной мембраны, а также с корецепторами CCR5 и/или CXCR4, взаимодействие с которыми активирует процесс слияния мембран, ведущий к проникновению вирусного генома в клетки-мишени (см., напр., [1–3]). Важная роль белка gp120 в процессе клеточного тропизма объясняет тот факт, что в последние годы он находится в центре внимания исследователей, занимающихся разработкой лекарственных препаратов для терапии ВИЧ-инфекции. Однако высокая вариабельность аминокислотной последовательности этого функционально значимого белка ВИЧ-1 является серьезным препятствием на пути решения данной проблемы [1–3]. Тем не менее известно [1–3], что, несмотря на интенсивные мутации, отдельные сегменты gp120, содержащие аминокислоты, критические для клеточного тропизма, сохраняют 3-мерную структуру в различающихся вирионах ВИЧ-1, образуя слабые звенья в системе защиты вируса. В связи с этим особую важность для успешного выполнения работ по созданию новых противовирусных препаратов приобретает задача, связанная с идентификацией химических соединений, способных эффективно блокировать инвариантные элементы структуры белка gp120 ВИЧ-1.

До присоединения тримера белка gp120 к молекуле CD4 его функционально важные консервативные эпитопы располагаются в углублениях и дополнительно прикрыты гликановыми «щитами», а также петлями с вариабельными участками [1; 2]. Поэтому индуцированные к белку gp120 антитела не могут воспрепятствовать взаимодействию ВИЧ-1 с молекулой CD4. Однако связывание вируса с рецептором CD4 вызывает конформационные изменения gp120, сопровождающиеся его пространственной переориентацией, в результате которой обнажаются консервативные участки специфического и высокоаффинного связывания с хемокиновыми корецепторами. В свою очередь, взаимодействие с корецептором инициирует структурные изменения трансмембранного белка gp41, необходимые для слияния наружной оболочки вируса с мембраной клетки-мишени [1–3]. Антитела к белку gp120 ВИЧ-1 способны заблокировать участки, активированные в результате связывания гликопротеина с молекулой CD4. Однако у большинства пациентов образуются типоспецифические антитела, распознающие штамм, циркулирующий в их организме, но слабо нейтрализующие модификации ВИЧ-1, выделенные от других пациентов [4–6]. Тем не менее в последние годы зарегистрированы случаи выработки широкого спектра перекрестно реагирующих нейтрализующих антител, включающего антитела к консервативным участкам связывания gp120 с рецептором CD4 и корецепторами, а также к важному для слияния вируса с мембраной клетки-мишени домену белка gp41 [4–6]. В частности, моноклональные антитела (МКА) VRC01 и VRC02 проявляют широкую (более 90 %) нейтрализующую активность к набору вирусов, полученных из различных подтипов, специфически взаимодействуя с консервативным эпитопом белка gp120, ответственным за связывание ВИЧ-1 с первичным рецептором CD4 [4–6].

Безусловно, идентификация антител с широким спектром нейтрализующей активности является важным шагом к разработке вакцины против ВИЧ-1. Однако уникальные свойства вируса, такие как экстраординарная изменчивость, способность избегать реакций системы приобретенного иммунитета, неспособность вызывать выработку разных антител, раннее наступление латентной фазы в его жизненном цикле и отсутствие здоровой иммунной системы создают беспрецедентные препятствия на этом пути [4–6].

В связи с обнаружением антител к ВИЧ-1 с широкой нейтрализацией представляется актуальным поиск низкомолекулярных соединений, способных имитировать фармакофорные свойства антиген-связывающих центров этих иммуноглобулинов.

Цель исследования – на основе анализа структурного комплекса МКА VRC01 с белком gp120 ВИЧ-1 [7] осуществить виртуальный скрининг химических соединений – потенциальных пептидомиметиков этого антитела. Методами молекулярного моделирования провести оценку их нейтрализующей активности с последующим отбором соединений, формирующих перспективные базовые структуры для разработки эффективных противовирусных препаратов нового поколения.

Для достижения поставленной цели в работе решены следующие задачи:

1. Выполнен анализ структурного комплекса Fab-фрагмента МКА VRC01 с белком gp120 ВИЧ-1 [7] и определены аминокислотные остатки антитела, вносящие определяющий вклад в его специфическое связывание с консервативным эпитопом оболочки вируса, ответственным за взаимодействия с первичным рецептором CD4.

2. На основе этих данных с помощью web-сервера pepMMsMIMIC (<http://mms.dsfarm.unipd.it/pepMMsMIMIC/>) [8] сформирован набор химических соединений, представляющих потенциальные пептидомиметики МКА VRC01.

3. Методами молекулярного докинга построены структурные комплексы полученных соединений с белком gp120 ВИЧ-1 и осуществлен отбор молекул, наиболее перспективных для дальнейших исследований.

4. Методами молекулярной динамики исследованы динамические характеристики комплексов и рассчитана свободная энергия их образования для лучших по данным докинга соединений.

5. Исходя из полученных результатов, идентифицированы химические соединения, подлежащие тестированию на анти-ВИЧ активность против широкого набора вариантов вируса.

Материалы и методы исследования. Структурный комплекс Fab-фрагмента МКА VRC01 с белком gp120 ВИЧ-1, установленный методом рентгеновской кристаллографии [7], заимствовали из Международного банка белков (код структуры 3NGB; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Для количественной оценки вкладов индивидуальных аминокислотных остатков антитела в свободную энергию образования комплекса использовали молекулярно-динамические (МД) расчеты, которые проводили с помощью программного пакета Amber 11 (<http://ambermd.org/>) в силовом поле Amber (набор параметров ff10) с явным заданием растворителя (трехточечная модель воды TIP3P). Структурный комплекс помещали в ячейку в форме усеченного октаэдра таким образом, чтобы наименьшее расстояние между ее гранями и атомами исследуемой системы превосходило 10 Å, после чего свободное пространство заполняли молекулами воды. Перед проведением МД расчетов энергию структурного комплекса минимизировали методами наискорейшего спуска (500 шагов) и сопряженных градиентов (1000 шагов). Затем осуществляли нагрев системы от 0 до 310 K в течение 1 нс при постоянном объеме ячейки. На следующем шаге в течение 1 нс уравнивали давление в системе, установленное на значении 1 атм, посредством динамического изменения размеров ячейки согласно схеме Берендсена и соавт. (<http://ambermd.org/>) с характерной частотой $2,0 \text{ пс}^{-1}$. На этапах нагрева и уравнивания давления накладывали дополнительные ограничения на положения атомов системы с помощью потенциала параболической формы с силовыми постоянными, равными соответственно 1,0 и 0,5 ккал/моль. Далее эти ограничения снимали и вновь подвергали систему релаксации в течение 2 нс в изобарно-изотермических условиях. На заключительном шаге моделирования проводили расчет МД траектории длительностью 5 нс. Для контроля температуры использовали термостат Ланжевена (<http://ambermd.org/doc10/>) с частотой столкновений $2,0 \text{ пс}^{-1}$. Интегрирование уравнений движения Нью-

тона осуществляли с помощью алгоритма «leap-frog» (<http://ambermd.org/doc10/>) с шагом интегрирования 2,0 фс. Для фиксации длин всех связей, в образовании которых участвуют атомы водорода, применяли алгоритм SHAKE (<http://ambermd.org/>). Максимальное расстояние, на котором учитывали невалентные взаимодействия, задавали равным 8,0 Å.

На следующем этапе полученные МД структуры использовали для расчета энергетических вкладов индивидуальных аминокислотных остатков Fab-фрагмента МКА VRC01 в свободную энергию образования комплекса «антитело/белок gp120». Для этой цели с помощью процедуры ММ-РВ/СА (пакет AMBER 11; <http://ambermd.org/>) вычисляли значения энтальпийной составляющей энергии связывания каждого остатка антитела с белком gp120 и усредняли их по 100 «точкам» МД траектории, разделенным временным интервалом длительностью 50 пс. В результате определяли аминокислотные остатки МКА VRC01, вносящие наибольший вклад в энергетическую стабилизацию структурного комплекса, и использовали их в качестве базовых структур для виртуального скрининга потенциальных пептидомиметиков антитела. Анализ структурного комплекса Fab-фрагмента МКА VRC01 с белком gp120 [7] показал, что критические для связывания остатки антитела взаимодействуют с тремя областями гликопротеина – петлей D, сегментом β 15- α 3 и участком V5/ β 24, которые входят в состав его CD4-связывающего эпитопа [9]. Поэтому эти остатки разделяли на три кластера согласно данным об их связывании с указанными сайтами белка gp120 и при формировании набора входных данных, анализируемых web-сервером репММsMIMIC [8], рассматривали различные комбинации остатков, принадлежащих разным кластерам. Полученный таким образом набор входных данных состоял из семи элементов структуры Fab-фрагмента МКА VRC01 (табл. 1).

Поиск пептидомиметиков осуществляли в базе данных ММsINC (<http://mms.dsfarm.unipd.it/MMsINC.html>) [10], содержащей 17 млн конформеров, рассчитанных для 3,9 млн коммерчески доступных химических соединений, с привлечением пяти методов, используемых программным обеспечением web-сервера репММsMIMIC [8]. Эти методы включают различные комбинации алгоритма «сверхбыстрого распознавания формы», суть которого состоит в обнаружении молекул, геометрически соответствующих заданному пептиду, с алгоритмами поиска по фармакофорам – молекулярным остовам, несущим существенные признаки, ответственные за биологическую активность [8]. В результате получали набор химических соединений – потенциальных пептидомиметиков МКА VRC01, эффективность связывания которых с белком gp120 ВИЧ-1 оценивали методами молекулярного докинга.

Молекулярный докинг найденных в базе данных ММsINC соединений с белком gp120 выполняли с помощью программы AutoDock Vina [11] с учетом конформационной подвижности лиганда, перебирая все его возможные ориентации относительно молекулы-рецептора. Структуру белка gp120 выделяли из его кристаллографического комплекса с Fab-фрагментом МКА VRC01 [7] (код 3NGB в Международном банке белков; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Атомы водорода добавляли с использованием пакета AutoDockTools (<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>). Для всех потенциальных пептидомиметиков анализировали комплексы, лучшие по величине энергии связывания, и идентифицировали соединения, взаимодействующие, как и МКА VRC01, с CD4-связывающим участком белка gp120. Для дальнейших исследований отбирали 50 молекул, наиболее перспективных согласно значению оценочной функции программы AutoDock Vina [11], включающей энергию водородных связей, вандер-ваальсовых и электростатических взаимодействий.

Геометрические параметры структурных комплексов этих молекул с белком gp120 оптимизировали методами наискорейшего спуска (500 шагов) и сопряженных градиентов (1000 шагов). Для параметризации лигандов использовали обобщенное силовое

Т а б л и ц а 1. Набор входных данных, использованный для поиска потенциальных пептидомиметиков МКА VRC01 в базе данных ММsINC

№	Входные данные
1	Trp50 ^H Asn58 ^H Arg61 ^H Gln64 ^H Arg71 ^H Glu96 ^L
2	Trp47 ^H Trp50 ^H Lys52 ^H
3	Asn58 ^H Tyr59 ^H Arg61 ^H
4	Arg61 ^H Gln64 ^H Arg71 ^H
5	Gln64 ^H Arg71 ^H Tyr74 ^H
6	Arg61 ^H Gln64 ^H Arg71 ^H Tyr74 ^H
7	Tyr91 ^L Glu96 ^L Phe97 ^L

П р и м е ч а н и е: приведены номера остатков МКА VRC01 согласно их нумерации в структурном комплексе антитела с белком gp120 ВИЧ-1 [7].

Т а б л и ц а 2. Средние значения энтальпийной составляющей свободной энергии связывания для аминокислотных остатков МКА VRC01, критических для образования структурного комплекса антитела с белком gp120 ВИЧ-1

Остаток антитела VRC01	Энергия связывания, ккал/моль
Trp47 ^H	–4,6
Trp50 ^H	–6,3
Lys52 ^H	–2,8
Asn58 ^H	–8,1
Tyr59 ^H	–5,3
Arg61 ^H	–15,0
Gln64 ^H	–7,1
Arg71 ^H	–11,8
Tyr74 ^H	–3,0
Tyr91 ^L	–4,7
Glu96 ^L	–14,6
Phe97 ^L	–3,5

поле AMBER (<http://ambermd.org/>). Начальные координаты атомов водорода белка gp120 определяли с привлечением модуля xleap пакета AMBERTools 1.5 (<http://ambermd.org/>). Затем с помощью программы AMBER 11 генерировали МД траектории длительностью 5 нс согласно методике, использованной для МД моделирования структурного комплекса Fab-фрагмента МКА VRC01 с белком gp120 (см. выше). МД расчеты проводили в силовом поле AMBER с набором параметров ff10 при явном задании растворителя (модель воды TIP3P) с последующей оценкой методом ММ-PB/SA свободной энергии образования надмолекулярных структур. На заключительном этапе для 20 лучших комплексов проводили более длительные (30 нс) МД расчеты и ранжировали их по величине свободной энергии связывания. При этом первые 5 нс отводили на релаксацию системы и не учитывали при расчете свободной энергии.

В качестве критерия стабильности комплексов использовали средние значения свободной энергии и соответствующие им стандартные отклонения. Энтальпийную составляющую сво-

Т а б л и ц а 3. Химические соединения, идентифицированные в базе данных MMsINC как наиболее вероятные пептидомиметики МКА VRC01*

Код соединения	Систематическое название	Химическая формула	Молекулярная масса (Да)	LogP**	Число доноров водородной связи	Число акцепторов водородной связи
MMs02391040	(2R, 11S, 14R)-11-бензил-14-карбамоил-1-(4-гидроксифенил)-16-метил-3,6,9,12-тетраоксо-4,7,10,13-тетраазогептадекан-2-аммоний	$C_{28}H_{39}N_6O_6^+$	555,656	–1,48	6	6
MMs03919199	(3R, 6R, 9R)-14-амино-3-бензил-6-изопропил-9-((4-метил-2-оксо-2H-хромен-7-ил)карбамоил)-1,4,7-триоксо-1-фенил-2,5,8,13-тетраазотетрадекан-14-иминий	$C_{37}H_{44}N_7O_6^+$	682,802	1,06	4	5
MMs02489375	(R)-1-(((R)-1-((2-(((E)-2-(6-бром-1H-индол-3-ил)-винил)-амино)-2-оксоэтил)амино)-3-(3,4-дигидроксифенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-(1H-имидазол-4-ил)-1-оксопропан-2-аммоний	$C_{27}H_{29}N_7O_5^+$	611,477	0,848	8	7
MMs01727389	(1S, 2S, 3R, 4aS, 13BS, 14aS)-метил 3-(((4-((этоксикарбонил)окси)-3,5-диметоксибензоил)окси)-2,11-диметокси-5,7,8,13,13b,14,14a-додекагидроиндол [2', 3': 3,4] пиридо [1,2-b]изохинолин-1-карбоксилат	$C_{35}H_{42}N_2O_{11}$	666,724	4,79	1	8
MMs03927127	(S)-2-(((R)-1-(((R)-5-((амино (иминий) метил) амино)-1-((4-метил-2-оксо-2H-хромен-7-ил)амино)-1-оксопентан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенил-пропан-2-ил)карбамоил)пирролидин-1-ий	$C_{30}H_{39}N_7O_5^{+2}$	577,686	–1,67	3	4
MMs02408883	3,5-бис (3-(4-(4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)фенил)уреидо)-N, N-диэтилбензамид	$C_{31}H_{35}N_9O_3$	581,681	4,15	6	5

П р и м е ч а н и я: * – приведенные данные заимствованы из базы данных MMsINC [10]; ** – LogP – липофильность соединения (коэффициент распределения в системе н-октанол–вода).

бодной энергии вычисляли для 500 «точек» МД траектории с шагом 50 пс, а энтропийную – для 50 «точек» с шагом 500 пс.

Расчеты проводили на компьютерном кластере СКИФ-ОИПИ Объединенного института проблем информатики НАН Беларуси [12].

Результаты и их обсуждение. Исследование структурного комплекса МКА VRC01 с белком gp120, проведенное методом молекулярной динамики, показало (табл. 2), что определяющий вклад в его формирование вносит тяжелая цепь антитела, а именно ее аминокислотные остатки Trp-47, Trp-50, Lys-52, Asn-58, Tyr-59, Arg-61, Gln-64, Arg-71, Tyr-74. Кроме того, важную роль в стабилизации этой надмолекулярной структуры играют остатки Tyr-91, Glu-96 и Phe-97 легкой цепи МКА VRC01 (табл. 2). Использование этих остатков в качестве базовой структуры при формировании набора входных данных для web-сервера рерММsMIMIC (табл. 1) позволило идентифицировать 4282 структуры химических соединений – потенциальных пептидомиметиков МКА VRC01. В результате оценки эффективности их связывания с белком gp120 ВИЧ-1 методами молекулярного докинга и молекулярной динамики с последующим ранжированием по величине свободной энергии образования надмолекулярных структур были идентифицированы шесть соединений-лидеров, которые, как следует из экспериментов *in silico*, должны специфически и эф-

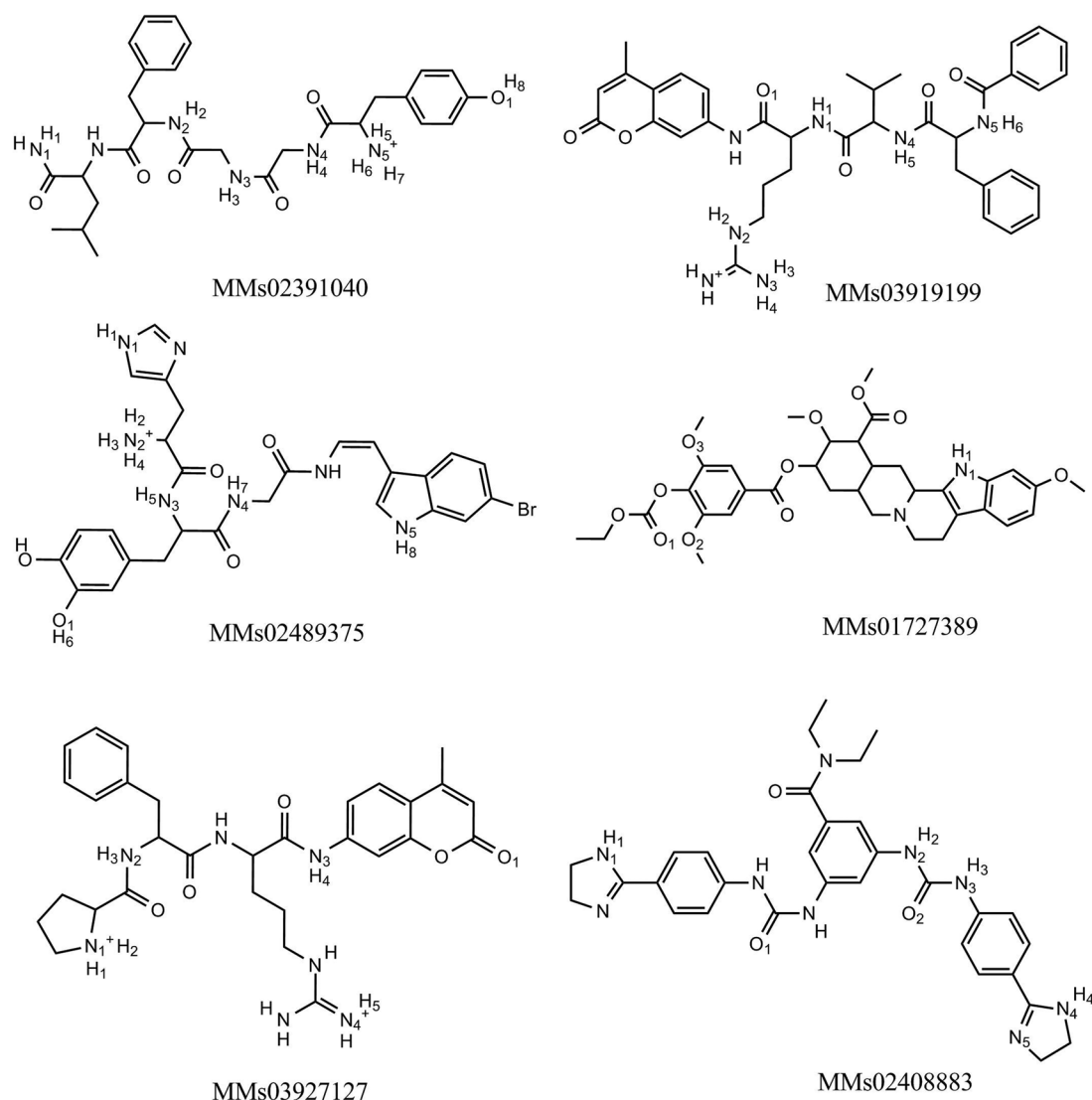


Рис. 1. 2-мерные структуры химических соединений – потенциальных пептидомиметиков МКА VRC01. Указаны коды молекул в базе данных MMslNC [10]. Пронумерованы элементы структуры пептидомиметиков, участвующие в специфических взаимодействиях с белком gp120 ВИЧ-1 (см. текст и табл. 4)

фективно взаимодействовать с белком gp120. Краткая информация об этих соединениях приведена в табл. 3, а на рис. 1 показаны их 2-мерные структуры.

Анализ межмолекулярных взаимодействий, реализующихся в статических моделях структурных комплексов найденных в базе данных MMsINC соединений с белком gp120, показывает (табл. 4), что важный вклад в их стабилизацию вносят водородные связи с участием аминокис-

Т а б л и ц а 4. Межмолекулярные взаимодействия, реализующиеся в структурных комплексах химических соединений MMs02391040, MMs03919199, MMs02489375, MMs01727389, MMs03927127 и MMs02408883 с белком gp120 ВИЧ-1

Пептидомиметик	Водородная связь ^{а, б}		Солевой мостик ^{а, в}
	Статическая модель	Динамическая модель	Статическая модель
MMs02391040	N ₂ H ₂ ...O _{D2} [*] [D ₃₆₈] N ₃ H ₃ ...O _{D2} [*] [D ₃₆₈] N ₅ H ₅ ...O _{D1} [*] [D ₃₆₈] O ₁ ...HN[G ₄₃₁] N ₁ H ₁ ...O[G ₄₂₉]	N ₃ H ₃ ...O _{D2} [*] [D ₃₆₈](85,9 %) N ₂ H ₂ ...O _{D2} [*] [D ₃₆₈](85,0 %) O ₁ H ₈ ...O[M ₄₂₆](64,5 %) N ₅ H ₅ ...O _{D1} [*] [D ₃₆₈](24,8 %) O ₁ H ₈ ...O[G ₄₂₉](20,3 %)	N ₅ H ₅ H ₆ H ₇ ... D ₃₆₈ [*]
MMs03919199	N ₂ H ₂ ...O [*] [N ₄₂₅] N ₃ H ₃ ...O _{D1} [*] [D ₃₆₈] N ₄ H ₅ ...O _{D2} [*] [D ₃₆₈] N ₅ H ₆ ...O _{D2} [*] [D ₃₆₈]	N ₄ H ₅ ...O _{D2} [*] [D ₃₆₈](97,8 %) N ₅ H ₆ ...O _{D2} [*] [D ₃₆₈](64,4 %) N ₂ H ₂ ...O _{D1} [*] [D ₃₆₈](24,0 %) N ₁ H ₁ ...O _{D1} [*] [D ₃₆₈](22,8 %)	N ₃ H ₃ H ₄ ... D ₃₆₈ [*]
MMs02489375	O ₁ H ₆ ...O[W ₄₂₇] N ₂ H ₂ ...O _{D2} [*] [D ₃₆₈] N ₁ H ₁ ...O[G ₄₇₃] N ₂ H ₃ ...O [*] [E ₃₇₀] N ₄ H ₇ ...O _{D2} [*] [D ₃₆₈] N ₅ H ₈ ...O[M ₄₂₆]	N ₂ H ₂ ...O [*] [E ₃₇₀](89,8 %) N ₂ H ₄ ...O _{D2} [*] [D ₃₆₈](62,2 %) N ₂ H ₄ ...O _{D1} [*] [D ₃₆₈](52,3 %) N ₄ H ₇ ...O _{D2} [*] [D ₃₆₈](27,8 %)	N ₂ H ₂ H ₃ H ₄ ... D ₃₆₈ [*] N ₂ H ₂ H ₃ H ₄ ... E ₃₇₀ [*]
MMs01727389	N ₁ H ₁ ...O[G ₄₇₃] O ₁ ...HN[S ₃₆₅] O ₃ ...HO [*] [T ₄₅₅]	N ₁ H ₁ ...O[G ₄₇₃](45,1 %)	
MMs03927127	N ₃ H ₄ ...O[G ₄₇₃] O ₁ ...HO [*] [T ₄₅₅] N ₂ H ₃ ...O _{D2} [*] [D ₃₆₈] N ₁ H ₁ ...O _{D1} [*] [D ₃₆₈] N ₁ H ₂ ...O [*] [N ₄₂₅] N ₄ H ₅ ...O[G ₄₂₉] N ₄ H ₆ ...N[T ₄₃₀]	N ₁ H ₁ ...O _{D2} [*] [D ₃₆₈](57,5 %) N ₁ H ₁ ...O _{D1} [*] [D ₃₆₈](52,4 %) N ₂ H ₃ ...O _{D1} [*] [D ₃₆₈](49,8 %) N ₁ H ₂ ...O [*] [E ₃₇₀](45,8 %) N ₂ H ₃ ...O _{D2} [*] [D ₃₆₈](38,0 %)	N ₁ H ₁ H ₂ ... D ₃₆₈ [*]
MMs02408883	N ₂ H ₂ ...O [*] [E ₄₆₆] N ₄ H ₄ ...O [*] [T ₄₆₇] O ₁ ... HN [*] [N ₂₈₀] O ₁ ...HN [*] [R ₄₅₆]	O ₁ ...HN [*] [R ₄₅₆](60,9 %) N ₂ H ₂ ...O [*] [E ₄₆₆](52,7 %) N ₃ H ₃ ...O [*] [E ₄₆₆](50,2 %) N ₄ H ₄ ...O _{D2} [*] [D ₄₅₇](30,6 %) N ₃ H ₃ ...O [*] [E ₄₆₆](27,6 %) N ₂ H ₂ ...O [*] [E ₄₆₆](27,5 %) N ₅ ...HO [*] [T ₄₆₇](21,9 %) O ₁ ...NH [*] [R ₄₆₅](21,0 %)	

П р и м е ч а н и я: ^а – водородные связи и солевые мостики в статических моделях структурных комплексов пептидомиметиков МКА VRC01 с белком gp120 ВИЧ-1 анализировали с помощью программного пакета BINANA [13]. Для идентификации водородных связей в динамических моделях использовали программный пакет AMBER 11 (<http://ambermd.org/doc10/>); ^б – первыми указаны доноры или акцепторы водородной связи, принадлежащие молекуле пептидомиметика, а вторыми – соответствующие функциональные группы аминокислотных остатков белка gp120, приведенных в квадратных скобках в однобуквенном коде. Звездочками отмечены атомы или группы, принадлежащие боковым цепям этих остатков. Нижние индексы атомов пептидомиметиков согласуются с их нумерацией, приведенной на рис. 1. В круглых скобках представлены частоты встречаемости водородных связей на МД траекториях структурных комплексов. Приведены водородные связи с частотой, превышающей 20 %; ^в – первыми указаны функциональные группы пептидомиметиков (рис. 1), а вторыми – аминокислотные остатки белка gp120.

лотных остатков белка gp120, критических для его специфического связывания с первичным рецептором CD4. Так, согласно расчетным данным, четыре соединения – MMs02391040, MMs03919199, MMs02489375 и MMs03927127 образуют водородные связи с Asp-368 белка gp120; кроме того, для них всех характерно наличие солевого мостика с указанным остатком гликопротеина (табл. 4). Следует отметить, что солевой мостик между Asp-368 и Arg-71^H МКА VRC01 постулирован методом рентгеновской кристаллографии в структурном комплексе антитела с белком gp120 ВИЧ-1 [7]. Полученные данные представляют значительный интерес, так как известно, что Asp-368 играет важную роль для клеточного тропизма ВИЧ-1, взаимодействуя с остатком Arg-59 первичного рецептора CD4 [9]. В расчетном комплексе MMs01727389/gp120 наблюдается водородная связь между иминогруппой N₁H₁ пептидомиметика и остатком Gly-473 белка gp120 (табл. 4), который представляет одну из аминокислот, с помощью которых ВИЧ-1 взаимодействует с Phe-43 молекулы CD4 [9] – остатком, являющимся, наряду с Arg-59, ключевым для связывания вируса с клеткой-мишенью. Соединение MMs02408883 формирует 4 водородные связи с белком gp120 (табл. 4), характерные и для МКА VRC01 [7], а также участвует в специфическом катион- π взаимодействии с остатком Arg-456 гликопротеина.

Анализ структурных комплексов потенциальных пептидомиметиков МКА VRC01 с белком gp120 ВИЧ-1 (рис. 2) свидетельствует о том, что пять из шести соединений – MMs02391040, MMs03919199, MMs02489375, MMs01727389 и MMs03927127 – используют для связывания с вирусом один и тот же участок белка gp120, формирующий на его поверхности гидрофобный молекулярный «карман», называемый Phe-43-связывающей полостью [9]. По данным рентгеновской кристаллографии [9], этот участок гликопротеина включает аминокислотные остатки Glu-370, Ile-371, Asn-425, Met-426, Trp-427 и Gly473, принимающие непосредственное участие во взаимодействии с остатком Phe-43 молекулы CD4, который, как было отмечено выше, является критическим для специфического связывания ВИЧ-1 с клетками иммунной системы. При этом одно из колец, входящих в состав рассматриваемых соединений (рис. 1), погружается в молекулярный «карман» белка gp120, блокируя остатки, функционально важные для его взаимодействия с Phe-43 первичного рецептора CD4 (рис. 2, *a–d*). В частности, соединение MMs02391040 содержит остаток фенилаланина (рис. 1), и именно его бензольное кольцо располагается внутри Phe-43-связывающей полости белка gp120 (рис. 2, *a*), что должно приводить к блокировке взаимодействия гликопротеина с остатком Phe-43 молекулы CD4.

В отличие от рассмотренных выше молекул, взаимодействующих с Phe-43-связывающей полостью белка gp120 (рис. 2, *a–d*), соединение MMs02408883 частично перекрывает петлю D и сегмент V5/ β 24 гликопротеина (рис. 2, *e*). При этом, как и МКА VRC01 [7], молекула MMs02408883 образует водородную связь с Asn-280 (табл. 4) и таким образом маскирует остатки Asn-279, Asn-280, Ala-281 петли D (рис. 2, *e*), участвующие в донорно-акцепторных взаимодействиях с первичным рецептором CD4 [9]. Кроме того, контактируя с областью V5/ β 24, эта молекула вступает в водородное связывание с остатком Arg-456 петли V5, а также формирует водородные связи с остатками Glu-466 и Thr-467 сегмента β 24 (табл. 4), наблюдаемые в структурном комплексе Fab-фрагмента МКА VRC01 с белком gp120 [7].

Данные молекулярно-динамических расчетов структурных комплексов пептидомиметиков МКА VRC01 с белком gp120 подтверждают выводы, сделанные на основе анализа результатов молекулярного докинга. Согласно этим данным (табл. 4), на МД траекториях преобладают структуры, в которых присутствуют межмолекулярные водородные связи с участием функционально важных остатков белка gp120, таких как Asp-368 (соединения MMs02391040, MMs03919199, MMs02489375, MMs03927127), Glu-370 (MMs02489375), Arg-456 и Glu-466 (MMs02408883). При этом сохраняются и солевые мостики, наблюдаемые в статических моделях комплексов соединений MMs02391040, MMs03919199, MMs02489375, MMs03927127 с белком gp120 (табл. 4), что подтверждает анализ соответствующих надмолекулярных структур, реализующихся в последней «точке» их МД траекторий. Структурные комплексы, построенные методами молекулярного докинга, энергетически стабильны, о чем свидетельствуют средние значения свободной энергии их образования и соответствующие величины стандартных отклонений (табл. 5). Анализ данных табл. 5 показывает, что межмолекулярные взаимодействия соединения

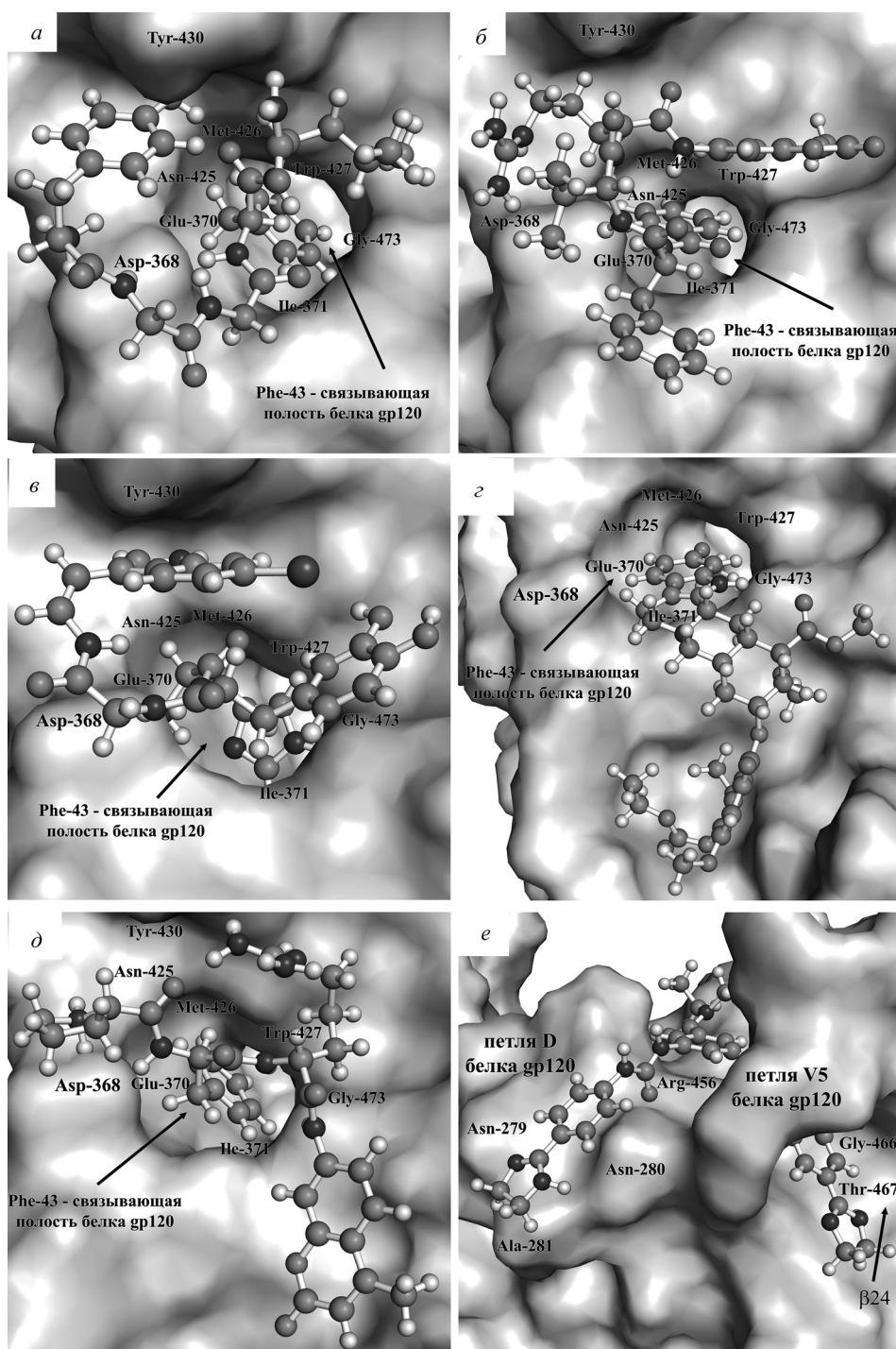


Рис. 2. Структурные комплексы соединений MMs02391040 (а), MMs03919199 (б), MMs02489375 (в), MMs01727389 (г), MMs03927127 (д) и MMs02408883 (е) с белком gp120 ВИЧ-1. Показаны фрагменты поверхности белка gp120, формирующие сайты связывания для пептидомиметиков МКА VRC01: Phe-43-связывающая полость (а–д) и участок V5/β24 (е). Отмечены аминокислотные остатки гликопротеина, вносящие определяющий вклад в специфическое связывание с этими химическими соединениями

MMs02391040 с белком gp120 характеризуются гораздо более низким значением энергии связывания по сравнению с величиной $-9,5 \pm 0,1$ ккал/моль, измеренной экспериментальными методами для комплекса gp120/CD4 [14]. Близкие к этой величине значения свободной энергии наблюдаются для соединений MMs03919199, MMs02489375, MMs03927127 и MMs02408883 (табл. 5).

Очевидно, что временной интервал, использованный нами для проведения МД расчетов, недостаточен для того, чтобы проанализировать все возможные структурные варианты ком-

Т а б л и ц а 5. Средние значения свободной энергии $\langle \Delta G \rangle$ образования комплексов пептидомиметиков МКА VRC01 с белком gp120 ВИЧ-1 и соответствующие им стандартные отклонения ΔG_{STD}

Пептидомиметик	$\langle \Delta H \rangle$, ккал/моль	$(\Delta H)_{\text{STD}}$, ккал/моль	$\langle \Delta S \rangle$, ккал/моль	$(\Delta S)_{\text{STD}}$, ккал/моль	$\langle \Delta G \rangle$, ккал/моль	ΔG_{STD} , ккал/моль
MMs02391040	-42,7	6,0	-22,8	7,0	-19,9	6,5
MMs03919199	-34,3	7,7	-23,0	8,3	-11,3	8,0
MMs02489375	-31,7	7,0	-23,6	9,0	-8,1	7,9
MMs01727389	-30,4	4,6	-29,2	8,1	-1,2	6,1
MMs03927127	-40,4	9,7	-30,3	6,7	-10,1	8,1
MMs02408883	-33,1	6,1	-24,7	7,3	-8,4	6,7

П р и м е ч а н и е. $\langle \Delta H \rangle$ и $\langle \Delta S \rangle$ – соответственно средние значения энтальпийной и энтропийной составляющих свободной энергии; $(\Delta H)_{\text{STD}}$ и $(\Delta S)_{\text{STD}}$ – соответствующие этим значениям стандартные отклонения.

плексов химических соединений MMs02391040, MMs03919199, MMs02489375, MMs01727389, MMs03927127 и MMs02408883 с белком gp120 ВИЧ-1. Однако результаты расчетов, выполненных для шести стартовых моделей, представляющих статические структуры комплексов шести разных соединений с белком gp120 ВИЧ-1, показывают, что во всех рассматриваемых случаях они обладают сходными динамическими характеристиками. Это позволяет предполагать, что полученные с помощью молекулярной динамики результаты адекватно отражают основные динамические особенности исследованных надмолекулярных структур.

Заключение. Совместный анализ статических и динамических моделей структурных комплексов соединений MMs02391040, MMs03919199, MMs02489375, MMs01727389, MMs03927127 и MMs02408883 с белком gp120 ВИЧ-1 свидетельствует о наличии специфических и эффективных взаимодействий между ними, приводящих к маскировке аминокислотных остатков гликопротеина, критических для связывания вируса с первичным рецептором CD4 клетки-мишени (рис. 2). По данным молекулярной динамики, комплексы этих соединений с белком gp120 не испытывают существенных структурных преобразований в течение МД расчетов и характеризуются низкими значениями свободной энергии образования надмолекулярных структур (табл. 5).

Таким образом, данные молекулярного моделирования указывают на то, что химические соединения, обнаруженные в результате компьютерного поиска в базе данных MMsINC, способны к эффективной блокаде консервативных и функционально важных участков CD4-связывающего эпитопа белка gp120, и поэтому они должны пройти тестирование на анти-ВИЧ активность против широкого набора вирусных частиц.

В заключение отметим, что после опубликования данных рентгеноструктурного анализа комплекса МКА VRC01 с белком gp120 ВИЧ-1 [7] Международный банк белков (<http://www.rcsb.org/pdb/>) пополнился рядом файлов, описывающих структуры Fab-фрагментов анти-ВИЧ антител с широкой нейтрализацией, блокирующих консервативные участки оболочки вируса, отличные от CD4-связывающего эпитопа белка gp120 [4–6]. Очевидно, что в результате компьютерного поиска пептидомиметиков этих антител с помощью подхода, использованного в настоящей работе, могут быть найдены потенциальные терапевтические агенты с новыми механизмами действия, что позволит сформировать наборы соединений различных классов – перспективных кандидатов на роль базовых структур для создания эффективных противовирусных препаратов нового поколения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект X12-022).

Литература

1. Andrianov A. M. // Expert Opin. Drug Discov. 2011. Vol. 6. P. 419–435.
2. Sirois S., Sing T., Chou K. C. // Cur. Prot. Pept. Sci. 2005. Vol. 6. P. 413–422.
3. Engelman A., Cherepanov P. // Nature Rev. 2012. Vol. 10. P. 279–290.
4. Walker L. M., Burton D. R. // Cur. Opin. Immunol. 2010. Vol. 22. P. 358–366.
5. Kwong P. D., Mascola J. R., Nabel G. J. // Cold Spring Harbor Perspect. Med. 2011. Vol. 1. a007278.

6. McCoy L. E., Weiss R. A. // J. Exp. Med. 2013. Vol. 210. P. 209–223.
7. Zhou T., Georgiev I., Wu X. et al. // Science. 2010. Vol. 329. P. 811–817.
8. Floris M., Masciocchi J., Fanton M., Moro S. // Nucl. Acids Res. 2011. Vol. 39, suppl. 2. P. W261–W269.
9. Kwong P. D., Wyatt R., Robinson J. et al. // Nature. 1998. Vol. 393. P. 648–659.
10. Masciocchi J., Frau G., Fanton M. et al. // Nucl. Acids Res. 2009. Vol. 37, Database issue. P. D284–D290.
11. Trott O., Olson A. J. // J. Comput. Chem. 2010. Vol. 31. P. 455–461.
12. Абламейко С. В., Абрамов С. М., Анищенко В. В. и др. Суперкомпьютерные конфигурации СКИФ. Минск, 2005. – 170 с.
13. Durrant J. D., McCammon J. A. // J. Mol. Graph. Model. 2011. Vol. 29. P. 888–893.
14. Myszka D. G., Sweet R. W., Hensley P. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 9026–9031.

I. A. KASHYN, A. V. TUZIKOV, A. M. ANDRIANOV

andrianov@iboch.bas-net.by

**VIRTUAL SCREENING OF NOVEL ANTI-HIV AGENTS, PEPTIDOMIMETICS
OF MONOCLONAL ANTIBODY VRC01 EXHIBITING BROAD VIRAL NEUTRALIZATION**

Summary

Based on the analysis of the structural complex between neutralizing antibody VRC01 and the HIV-1 gp120 protein, the virtual screening of chemical compounds able to mimic pharmacophore properties of the immunoglobulin antigen-binding site was carried out. Using the molecular modeling, the complexes of these compounds with gp120 were built and the evaluation of their potential inhibitory activity was performed followed by the calculation of free energy of formation of supramolecular structures. As a result, top-six compounds, which specifically and effectively interact with amino acid residues of gp120 critical for its binding to the primary receptor CD4 of target cell, were selected. In the light of the findings obtained, the identified compounds are considered as promising basic structures for the design of novel anti-HIV drugs with broad viral neutralization.